

マウス子宮腺筋症における低分子量 MMP の発現について

札幌医科大学医学部産婦人科学教室

森 悟子 藤井 美穂 工藤 隆一

Expression of the Small Molecular Weight Matrix Metalloproteinase in Adenomyosis of the Mouse Uterus

Satoko MORI, Miho FUJII and Ryuichi KUDO

*Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Sapporo Medical University, Sapporo*

概要 子宮腺筋症は、子宮内膜腺、間質細胞からなる基本構造を備えた組織が、異所性に子宮筋層内に発育し、増殖する良性疾患である。しかし、筋層に浸潤していくその組織形態は悪性組織に類似した性格をもつ。今回、マウス子宮腺筋症モデルを作製し、子宮腺筋症の増殖、進行と MMP との関係を中心に解析し、以下の結果を得た。

1. SHN 系マウスの脳下垂体を異所性に子宮腔内に移植することにより子宮腺筋症を誘導し、誘導された子宮腺筋症組織を用いた gelatin zymography において、分子量約 20~30kDa の gelatin 消化活性を有するバンドを認めた。この酵素活性は正常子宮筋組織には認められず、EDTA により抑制された。

2. この新たに確認された低分子量 MMP と既知の低分子量 MMP である pump-1 との類似性を RT-PCR 法により検討した。pump-1 の発現がすでに確認されている産褥子宮筋、腎臓とともに、子宮腺筋症、正常子宮筋組織すべてに pump-1 の mRNA 由来の cDNA の増幅を認めた。

3. マウス正常産褥子宮筋から pump-1 の Digoxigenin 標識 oligonucleotide probe を作製し、Southern blotting hybridization を施行した。RT-PCR の結果と同様に、産褥子宮筋、腎臓、子宮腺筋症、正常子宮筋組織すべてにおいて DNA の検出が認められた。以上より、ヒト pump-1 と類似した DNA 配列をもつ低分子量の MMP が、正常子宮筋組織、子宮腺筋症ともに DNA レベルで発現しているものの、子宮腺筋症のみにおいて特異的に MMP 活性を有していることが明らかとなった。この低分子量の MMP の活性化が子宮腺筋症の発生、増殖過程に関与している可能性が示唆された。

Synopsis The etiology and the pathogenesis of adenomyosis, which is a benign disease featuring ectopic proliferation and invasion of the endometrial stromas and glands into the myometrium, as seen with malignant tumor cells, are still unknown. Adenomyosis induced in mice by intrauterine pituitary isografts was analyzed to study the relationship between adenomyosis and matrix metalloproteinase. Under zymography, adenomyosis showed a gelatiolytic band of 20-30kDa, which was inhibited by EDTA. We then compared matrix metalloproteinase, which is a small protein, with the known pump-1 (MMP7) utilizing RT-PCR and southern blotting hybridization. The PCR product from pump-1 mRNA was clearly detected in both adenomyosis and normal uterus, as in postpartum uterus and kidney in which pump-1 is expressed. These results were confirmed by southern blotting hybridization, and closely resembled the results obtained with RT-PCR. Our study suggests that the small molecular weight matrix metalloproteinase, which is virtually identical to pump-1, may play important roles in adenomyosis at the level of gene transcription, activation, inhibition or otherwise.

Key words: Adenomyosis • Small molecular weight metalloproteinase • Pump-1

緒 言

子宮腺筋症は、病理組織学的には良性であるが、

子宮内膜腺細胞と間質細胞からなる基本構造を備えた組織が、異所性に子宮内筋層内に発育し、機

能する奇異な疾患である¹⁾。

正常子宮内膜が子宮筋層へ異所性に増殖したものととして最初に報告したのは Rokitansky²⁾である。一方、外性子宮内膜症の発生機序としては、Iwanoff の化生説、Sampson の播種説が代表的であるが、いずれも問題点を含み、いまだに統一された結論は得られていない。外性子宮内膜症とは機序が異なるとされている子宮腺筋症では Cullen³⁾が1908年に正常子宮内膜の深部増殖説を提唱し、この説が支持されてきた。しかし、子宮内膜の基本構造を備えた組織が、どのような機序で異所性に発育し、機能するのか、また、癌細胞のように正常組織を破壊し、増殖、進展するのかなど、単に深部増殖説のみで説明することは不可能であり、依然として謎に包まれた部分が多い。本症の腫瘍的性質から、発生及び進展の機序に癌の浸潤、転移に類似した機構の存在が示唆される。

一方、癌細胞の特徴として、周辺組織、基底膜を破壊、分解する能力が高いことが広く知られている。癌細胞が、正常組織の中を浸潤、転移していく過程において、基底膜や結合組織といった細胞外マトリックスの融解が関与していると考えられ、Matrix Metalloproteinase (以下、MMP) の発現が浸潤、転移の主要な機序の一つであることが報告されている⁴⁾⁵⁾。

そこで、子宮腺筋症の発生及び進展と MMP との関係を検討するために、マウス子宮腺筋症モデルを作製し、これにより誘導された子宮腺筋症組織を用い、gelatin zymography を施行した。さらに、遺伝子学的手法を用い、マウス子宮腺筋症モデルに特異的に発現する低分子量 MMP について、reverse transcription polymerase chain reaction (以下、RT-PCR) 及び Southern blotting hybridization を用い、この低分子量 MMP と既知の MMP である pump-1 との類似性について検討した。

研究方法

1. 組織標本作製

共同研究者の Mori et al.⁶⁾の方法により、SHN 系マウスの子宮腔内に、同系の下垂体を異所性に子宮腔内に移植することにより外性のエストロゲ

ンなどの影響を受けることなく、子宮腺筋症の発生を誘導した。誘導された子宮腺筋症組織を採取し、一部をホルマリン固定後、HE 染色にて腺筋症の発生を組織学的に観察した。腺筋症の発生が組織学的に確認された検体を gelatin zymography, RT-PCR, Southern blotting hybridization に用いた。

2. gelatin zymography

gelatinase 活性は gelatin zymography により測定した。HE 染色にて確認された子宮腺筋症組織を細切後、ホモジナイザーにて破碎し、12,000g, 4°C, 20分超遠沈した上清を用い、10% (1mg/ml) の gelatin を含む SDS-PAGE 法でタンパクを分離し、37°C, 20~24時間インキュベート後、クマシブルー染色を行い、ゲル内に含まれる gelatin の消化活性を観察した (図1)。

3. RT-PCR 法

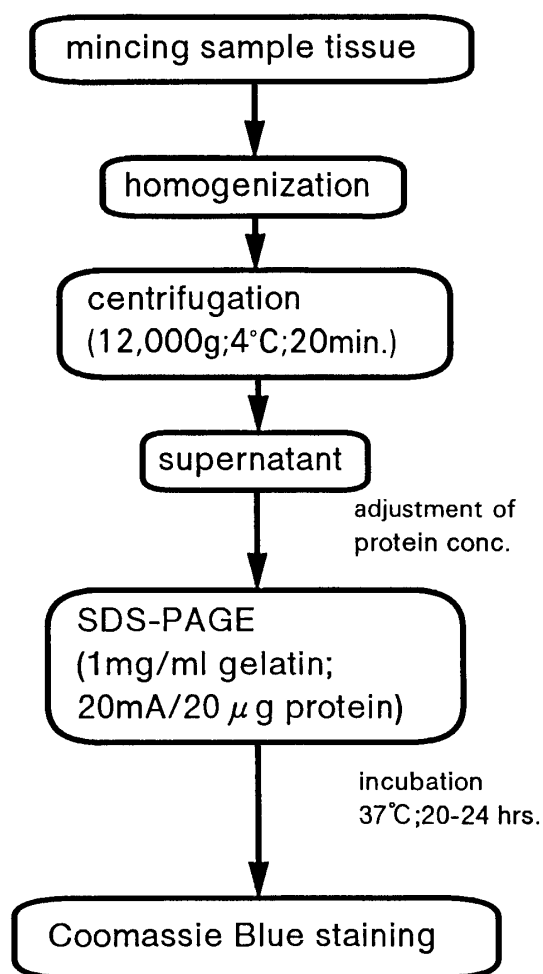


図1 gelatin zymography

AAG	AAC	AAT	TGT	CTC	TGG	ACG	GCA	GCT	ATG	30		
CGA	CTC	ACC	GTG	CTG	TGT	GCT	GTG	TGC	CTG			
.....												
ATG	CAA	AAA	TTC	TTT	GGC	CTA	CCT	ATA	ACT	300		
GGA	ATG	TTA	AAC	TCC	CGC	GTC	ATA	GAA	ATA			
ATG	CAG	AAG	CCC	AGG	TGT	GAA	GTG	CCA	GAT			
S→												
GTT	GCA	GAA	TAC	TCA	CTA	TTT	CCA	AAT	AGC			
CCA	AAA	TGG	ACT	TCC	AAA	GTG	GTC	ACC	TAC			
AGG	ATC	GTA	TCA	TAT	ACT	CGA	GAC	TTA	CCG			
.....												
CAT	ATT	ACA										
GAG	GAT	GAA	CGC	TGG	ACG	GAT	GGT	AGC	AGT	690		
CTA	CGG	ATT	AAC	TTC	CTG	TAT	GCT	GCA	ACT			
CAT	GAA	CTT	GGC	CAT	TCT	TTG	GGT	ATG	GGA			
←AS												
CAT	TCC	TCT	GAT	CCT	AAT	GCA	GTG	ATG	TAT			
CCA	ACC	TAT	GGA	AAT	GGA	GAT	CCC	CAA	AAT			
TTT	AAA	CTT	TCC	CAG	GAT	GAT	ATT	AAA	GGC			
ATT	CAG	AAA	CTA	TAT	GGA	AAG	AGA	AGT	AAT			
TCA	AGA	AAG	AAA	TAG	AAA	CTT	CAG					
GCA	GAA	CAT	CCA	TTC	ATT	CAT	TCA	TTG	GAT			
TGT	ATA	TCA	TTG	TTG	CAC	AAT	CAG	AAT	TGA			
.....												
ATG	TCA	ATA	AAT	GTT	ACA	TAC	ACA	AAT	AAA	1,100		
TAA	AAT	ATT	TAG	GCC	ATG	GTA	AAT	TTA	CCG			
AAT	TCC	GCC	GAT	ACT	GAC	GGG	C					

図2 Sequence of cDNA of pump-1. sense primer (S), antisense primer (AS)

1) total RNA の抽出

HE 染色にて確認された子宮腺筋症組織を採取し、速やかに -80°C で保存した後、Guanidinium Thiocyanate 法⁷⁾にて total RNA を抽出した。

2) mRNA の精製

total RNA より mRNA PURIFICATION KIT (BIOMAG 社) にて mRNA を精製した。

3) Reverse Transcriptase Reaction

得られた mRNA を鋳型とし、Super Script II を用い、 37°C 15分、 42°C 60分、 65°C 15分で反応を行い、cDNA を合成した。

4) primer の作製

Muller et al.⁸⁾により決定された cDNA 配列に基づき pump-1 の primer を作製した。図2のように sense primer (S) と antisense primer (AS) を選択した。

5) PCR Reaction

抽出した mRNA から合成した cDNA を template として、PCR を行った。PCR 反応の条件は、 92°C 2分、 52°C 1分、 72°C 1分を 1 cycle、 92°C 30秒、 52°C 1分、 72°C 2分を 38 cycle、 92°C 30秒、 52°C 1分、 72°C 10分を 1 cycle 行った。

6) Electrophoresis

反応終了後、反応液の一部を 1% アガロース電

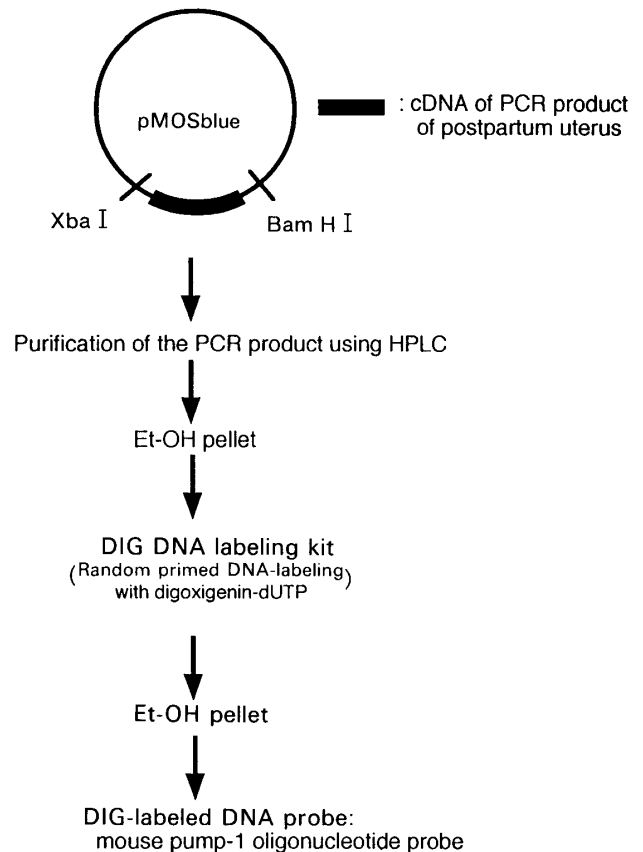


図3 産褥子宮の PCR product (S-AS) を用いた DIG-labeled DNA probe の作製法

気泳動を用い、エチジウムブロマイドにて染色し反応産物を確認した。

4. Southern blotting hybridization

RT-PCR の反応産物を確認するため、Southern blotting hybridization を施行した。RT-PCR により増幅された DNA 配列に対し、template DNA としてマウス産褥子宮筋より得た cDNA をプラスミドベクター (pMOSblue) から、XbaI, BamHI にて insert 配列を切り出した。insert 配列は、電気泳動後、HPLC により精製し、この DNA fragment より、DIG DNA labeling kit を用い、random primed labeling 法⁹⁾にて Digoxigenin で標識された mouse pump-1 oligonucleotide probe を作製した (図3)。

研究成績

1. 子宮腺筋症の発生

移植後 6 カ月で開腹し、子宮を摘出、子宮腺筋症組織を採取し、ホルマリン固定後、HE 染色を

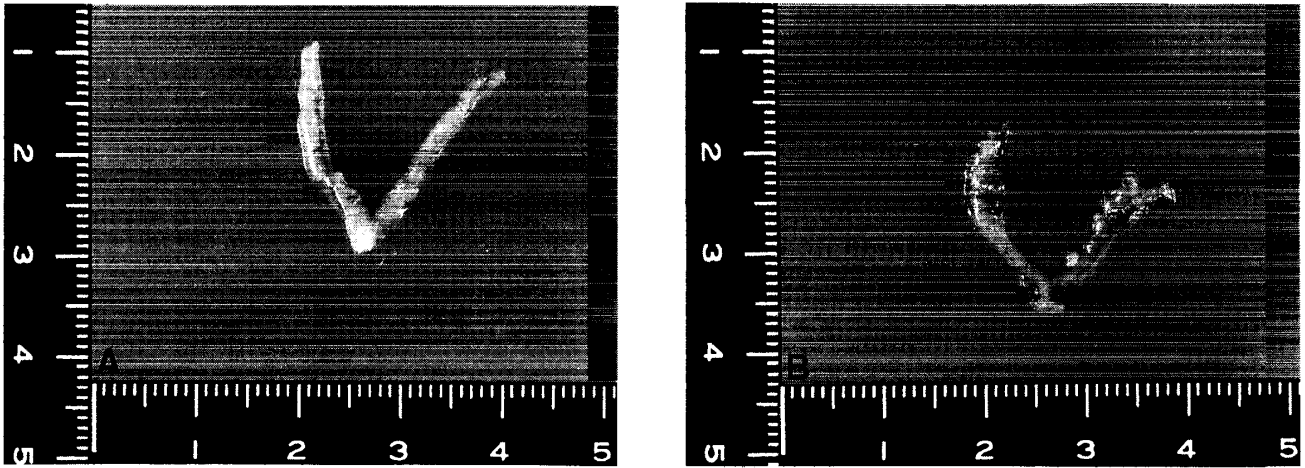


写真1. A. SHN系マウスの正常子宮, B. 移植後6カ月のSHN系マウスの子宮. 肉眼的に子宮内膜組織の増殖による子宮の増大, さらに子宮外への突出が認められる.

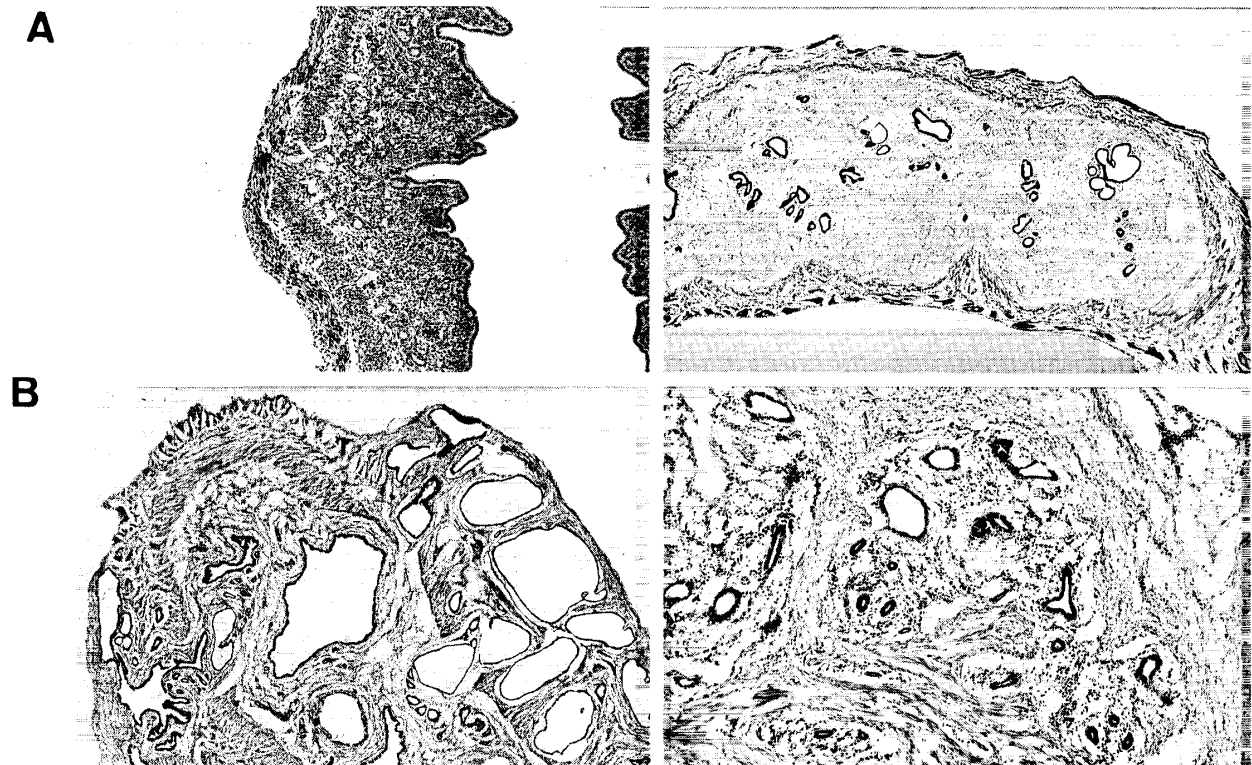


写真2 A. SHN系マウスの正常子宮. 子宮内膜基底層と内側, 外側筋層の3構造が保たれている.
B. 移植後6カ月のSHN系マウスの子宮. 子宮腺の増殖, 嚢胞状肥大が起こり, 子宮腺, 間質細胞が巣状に入り込み筋層間隙を深く切断し, 漿膜下に到達し, 子宮外に突出している(左: 弱拡大, 右: 強拡大).

行った. 肉眼的に子宮の増大と, 増殖した内膜症組織が漿膜下からさらに子宮外へ突出した所見が認められた(写真1). 組織学的には, 子宮腺の増殖, 嚢胞状肥大があり, 子宮腺, 間質細胞が巣状に筋層間隙に入り込み, 内外筋層を深く切断し, 漿膜下に到達し, 子宮外に突出した(写真2).

2. gelatin zymography

子宮腺筋症とMMP活性の発現との関係を検討するためにgelatin zymographyを施行したところ, 子宮腺筋症を認めたlane 1では20~30kDa付近にバンドが観察され, 正常子宮組織のlane 2ではバンドは観察されなかった. また, この活性

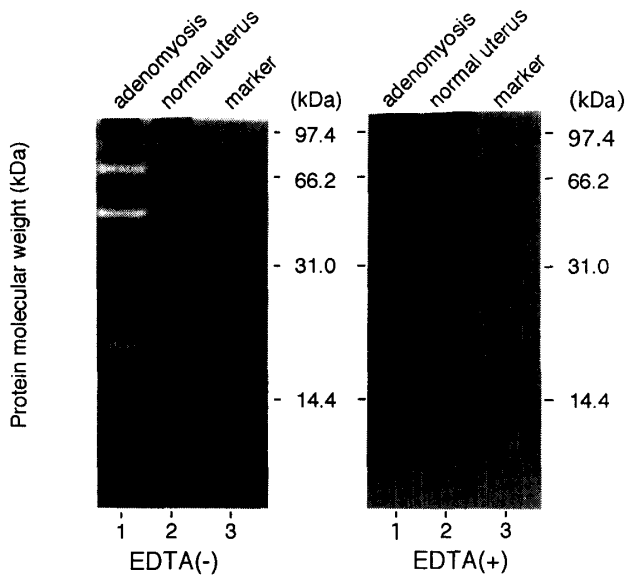


写真3 gelatin zymography. A. EDTA(-) lane 1: adenomyosis, 2: normal uterus, 3: marker, B. EDTA(+) lane 1: adenomyosis, 2: normal uterus, 3: marker, adenomyosisにおいて20~30 kDa付近に強いgelatin消化活性を認め、EDTAにより抑制された。

は、共通の inhibitor である EDTA により抑制された (写真3)。

3. RT-PCR, Southern blotting hybridization

この gelatin 消化活性をもつタンパクと既知の MMPs との類似性の検討を遺伝子学的手法を用いて試みた。既知の MMPs として低分子量の pump-1 を選択し、すでに pump-1 の発現が報告されている産褥子宮筋組織¹⁰⁾、腎臓組織¹¹⁾¹²⁾をコントロールとして、子宮腺筋症、正常子宮筋組織より mRNA を抽出し、これより作製した cDNA を用い、primer として、S と AS を選択し RT-PCR を行った。RT-PCR にて増幅した DNA をエチジウムブロマイドで染色したものを写真4に示す。正常子宮筋組織、産褥子宮筋組織、子宮腺筋症組織、腎臓組織における増幅をみると、すべての組織において予測された通りの440bp付近に増幅されたバンドを認めた。

これらの pump-1 mRNA 由来の cDNA について、産褥子宮筋より得た cDNA より、上述のように、Digoxigenin で標識された mouse pump-1 oligonucleotide probe を作製し、これを用いて

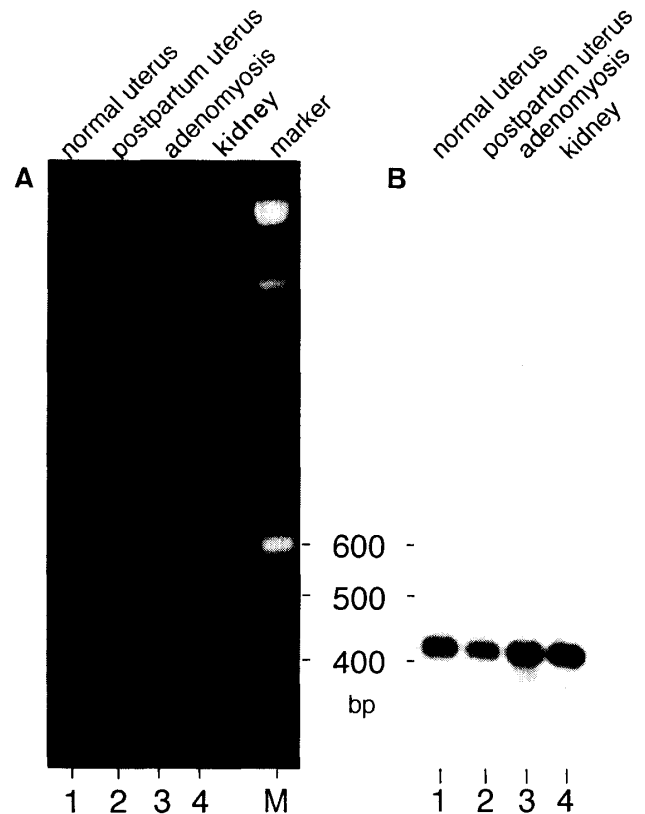


写真4 A. RT-PCR, B. Southern blotting hybridization analysis of each RT-PCR product with mouse pump-1 oligonucleotide probe. lane 1: normal uterus, lane 2: postpartum uterus, lane 3: adenomyosis, lane 4: kidney, M: marker

Southern blotting hybridization を施行したところ、RT-PCR の結果と同様に、すべての組織において440bp付近でのバンドが検出された (写真4)。

考 察

子宮腺筋症では、内膜腺、間質細胞は組織学的に良性の形態を維持しながら、あたかも癌細胞のように子宮筋層内に進展し増殖する。この腫瘍的性質から、発生及び進展の機序に癌の浸潤、転移に類似した機構の存在が示唆される。また、正所性子宮内膜と異所性子宮内膜では、異所性子宮内膜のほうが細胞増殖能が高いという報告もある¹³⁾。

今回用いた SHN 系マウスの子宮腔内に下垂体を移植することにより誘導された腺筋症組織は、筋層内に侵入し、腺と間質とを備えており、子宮内膜の子宮筋層内での異所性増殖という点でヒト

における子宮腺筋症の特徴を再現していると考えられた。共同研究者の Mori et al.¹⁴⁾は、まず筋層内に間質細胞が直接侵入した後、引き続き侵入した腺細胞が両者とも筋層内で増殖する組織形態を報告したが、これは、Cullen³⁾が子宮腺筋症の発生機序として提唱した正常子宮内膜の深部増殖説に一致している。

一方、MMP は癌細胞が浸潤、転移する際に重要な役割を果たす⁴⁾⁵⁾と注目されてきたが、最近、正常組織における発現については、ラットの産褥子宮筋に一過性に¹¹⁾、正常子宮内膜で月経周期により増殖期後期と月経期にホルモン依存性に¹⁵⁾¹⁶⁾、排卵期、骨再生期などの remodeling が起こる過程において¹⁷⁾、厳格に調節され、一過性に発現することも報告されている。

本研究では、癌細胞が浸潤する際に重要な役割を果たすと注目されてきた MMP が、子宮腺筋症の進展形式に関与するかどうかを検討した。zymography では、マウス子宮腺筋症においては、正常子宮組織では認められなかった20~30kDaの低分子量 gelatinase 活性が認められ、EDTAにて抑制されたことより、分子量20~30kDaのMMPの関与が明らかとなった。

20~30kDaに相当する分子量をもつ既知のMMPとしては pump-1, stromelysin 2などが挙げられ¹⁷⁾、さらに pump-1は子宮組織で証明されていることから¹¹⁾¹⁵⁾¹⁶⁾、今回活性を認めたMMPを pump-1と推定した。

pump-1はMMPの中で最小の分子量をもち、type IV collagen, glycoprotein, proteoglycanなどの細胞外基質を破壊し、collagenaseを活性化することが知られている¹⁸⁾。また、他のMMPと同様潜在型から活性型への変換も認められるが¹⁹⁾、活性化機構である cysteine switch mechanism²⁰⁾は欠如し²¹⁾、その機構は明らかではない。組織での発現については、ラットの産褥子宮筋に妊娠中の著明なコラーゲン増量をみた子宮筋層が短期間に組織構築の回復を達成するために一過性に発現するという報告¹⁰⁾を初めとして、腎組織では代謝活性の高い mesangial cell¹¹⁾¹²⁾、悪性疾患では、大腸癌²²⁾、前立腺癌²³⁾、乳癌²⁴⁾にお

ける発現など多くの報告がある。そこで、産褥子宮筋、腎組織をコントロールとして、RT-PCR, Southern blotting hybridizationにより検討した。その結果、予測された通りの440bp付近に増幅されたバンドを認め、マウス組織に発現した、この低分子量MMPはヒト pump-1と類似したDNA配列をもつものと考えられた。

マウス子宮腺筋症において、ヒト pump-1と類似したDNA配列をもつと考えられる低分子量のMMPが関与していることが明らかとなったが、遺伝子レベルでは、子宮腺筋症のみならず、正常子宮筋においても明らかにこのMMPの遺伝子の発現が認められた。しかし、この pump-1と類似のMMP活性は子宮腺筋症組織においてのみ特異的に発現していた。以上より、子宮腺筋症の発生、進展についてはMMPのmRNA以降の活性発現に至るまでの、非常に複雑かつ厳格な調節機序によるもの、すなわち、mRNA合成の転写レベル、活性化の過程、TIMPsなどのバランス関係などの段階¹⁹⁾²⁵⁾が、何らかの形で関与している可能性が示唆された。

文 献

1. 日本産科婦人科学会編. 子宮内膜症取扱い規約第1部, 東京: 金原出版, 1993; 1
2. Rokitansky K. Über Uterusdrusen-Neubildung in Uterus-unt Ovarialsarkomen. Ztschr K Gesellsch Aerzte Zu Wien 1860; 17: 577
3. Cullen TS. Adenomyoma of the Uterus. Philadelphia: WB Saunders and Co, 1908
4. Goldberg GI, Eisen AZ. Extracellular matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. Cancer Treat Res 1991; 53: 421-440
5. Steler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. Annu Rev Cell Biol 1993; 9: 541-573
6. Mori T, Nagasawa H, Takahashi S. The induction of adenomyosis in mice by intrauterine pituitary isografts. Life Sciences 1981; 29: 1277-1282
7. Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Analytical Biochemistry 1987; 162: 156-1594
8. Muller D, Quantin B, Gesnel MC, Million-

- collard R, Abecassis J, Breathnach R.* The collagenase gene family in humans consist of at least four members. *Biochem J* 1988 ; 253 : 187—192
9. *Feinberg AP, Vogelstein B.* A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 1983 ; 132 : 6—13
10. *Wossner JF, Taplin CJ.* Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 16918—16925
11. *Marti HP, Mcneil L, Thomas G, Davies M, Lovett DH.* Molecular characterization of a low-molecular-mass matrix metalloproteinase secreted by glomerular mesangial cells as PUMP-1. *Biochem J* 1992 ; 285 : 899—905
12. *Marcotte PA, Kozan IM, Dorwin SA, Ryan JM.* The matrix metalloproteinase pump-1 catalyzes formation of low molecular weight (pro) urokinase in cultures of normal human kidney cells. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 13803—13806
13. *Li SF, Nakajima K, Masuzaka H, Fujii S.* The number of proliferating cell nuclear antigen positive cells in endometriotic lesions differs from that in the endometrium. *Virchow's Arch Path Anat* 1993 ; 423 : 257—263
14. *Mori T, Ohta Y, Nagasawa H.* Ultrastructural changes in uterine myometrium of mice with experimentally-induced adenomyosis. *Experimentia* 1984 ; 40 : 1385—1387
15. *Rodgers WH, Osteen KG, Matrisian LM, Navre M, Giudice LCC, Gorstein F.* Expression and localization of matrisin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1993 ; 168 : 253—260
16. *Osteen KG, Rodgers WH, Gaire M, Hargrove JH, Gorstein F, Matrisian LM.* Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. *Proc Natl Acad Sci* 1994 ; 91 : 10129—10133
17. *Wossner JF.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB* 1991 ; 5 : 2145—2153
18. *Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG.* Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991 ; 64 : 327—336
19. *Quantin B, Murphy G, Breathnach R.* Pump-1 cDNA code for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry* 1989 ; 28 : 5327—5334
20. *VanWart HE, Birkedal-Hansen H.* The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci* 1990 ; 87 : 5578—5582
21. 佐藤 博. 癌転移にかかわる細胞結合膜型マトリックスメタロプロテアーゼ. *実験医学* 1995 ; 13 : 1037—1073
22. *Miyazaki K, Hattori Y, Umenishi F, Yasumitsu H, Umeda M.* Purification and characterization of extracellular matrix-degrading metalloproteinase, matrin (pump-1), secreted from human rectal carcinoma cell line. *Cancer Research* 1990 ; 50 : 7758—7764
23. *Pajouh MS, Nagel RB, Breathnach R, Finch JS, Brawer MK, Bowden GT.* Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991 ; 117 : 144—150
24. *Bsset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer JM, Chenard OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P.* A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990 ; 348 : 699—704
25. *Matrisian LM.* Metalloproteinase and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990 ; 6 : 121—125

(No. 7751 平8・3・15受付)